

# **Рекомбинантные белки как лекарственные средства**

Успехи генетической инженерии привели к тому, что свыше 100 белков человека (биорегуляторов, корректоров гомеостаза, факторов врожденного и приобретенного иммунитета) могут сохранять свою видоспецифичность. Они нарабатываются как лекарственные средства путем микробиологического синтеза. При этом технология рекомбинантной ДНК позволяет их совершенствовать: повышать физиологическую активность, снижать вероятность побочных реакций после введения и т.д. Основным при получении рекомбинантных белков является решение проблемы дефицита сырья, так как из человеческих тканей в промышленном масштабе получать их, естественно, невозможно.

При выборе микроорганизма (как продуцента чужеродного белка предполагаемого лекарственного препарата) необходимо:

- наиболее полно изучить геном;
- подробно исследовать метаболизм на уровне вида;
- чтобы микроорганизм обладал умеренной патогенностью (в идеале предполагается ее полное отсутствие);
- чтобы микроорганизм был способен расти в условиях

# Требования, предъявляемые к микроорганизмам

1. Микроорганизм-реципиент не должен обладать патогенностью и токсигенностью.
2. Безопасность генно-инженерных производных.
3. Быстро размножающиеся штаммы.
4. Желателен рост на простых питательных средах.
5. Возможность образования суспензий высокой плотности.

Избранные в качестве предполагаемых продуцентов микроорганизмы оцениваются и изучаются уже на уровне конкретных штаммов.

При необходимости штаммы-биообъекты (как носители чужеродного генетического материала и продуценты чужеродного белка) могут быть усовершенствованы методами генетической инженерии, что позволяет свести к минимуму вероятность протеолиза чужеродных белков, гидролиза чужеродной информационной РНК и «исключения» чужеродных генов из генома.

Таким образом, в данном случае общей целью является ограничение активности способствующих гомеостазу клетки систем репарации, включающих нуклеазы и протеазы.

В качестве **продуцентов рекомбинантных белков** человека чаще других в настоящее время используются: *Escherichia coli* (кишечная палочка), *Bacillus subtilis* (сенная палочка), *Saccharomyces cerevisiae* (пекарские дрожжи). Первые два микроорганизма — прокариоты, последний — эукариот. Эти организмы достаточно безопасны, однако попадание их (как продуцентов того или иного человеческого белка) в окружающую среду по ряду причин нежелательно. В связи с этим существуют принятые и тщательно соблюдаемые **правила работы с рекомбинантами.**

## Уровни безопасности.

Безопасность должна соблюдаться на генетическом и на физическом уровнях. Безопасность на генетическом уровне означает, что в геном продуцента чужеродного белка (помимо чужеродных генов) вносится еще одно изменение — из него удаляются некоторые гены, например, участвующие в синтезе аминокислоты, существенной для роста микроорганизма. Иными словами, организм делается зависимым от наличия в среде этой аминокислоты. Если же клетки данного микроорганизма оказываются вне среды, то они не размножаются, т.е. опасность заражения территории предприятия культурой рекомбинанта значительно уменьшается. Также продуценты чужеродного белка не отличаются высокой способностью к выживанию в природных условиях. Точнее, они утрачивают способность образовывать ненужный для них чужеродный белок, так как потеря этой способности ускоряет размножение клеток; медленно же размножающиеся клетки, которые продолжают

Меры безопасности принимаются и на физическом уровне: на всех местах выброса газа устанавливают микробиологические фильтры. По завершении рабочего цикла без разъединения системы, что может привести к понижению давления во всех емкостях, где могут оказаться клетки рекомбинанта, так как вследствие нарушения герметизации воздух вместе с чужеродными клетками будет втягиваться в систему, оборудование **стерилизуют**. И последнее — на производстве должны соблюдаться все требования «Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств» (GMP).

# Рекомбинантные белки, созданные некоторыми генно-инженерными микроорганизмами

## ВАКЦИНЫ

- Поверхностный антиген вируса гепатита В
- Белок малярийного плазмодия
- Белок оболочки HIV-1
- Белок капсида HIV

## ДИАГНОСТИКА

- Белок вируса гепатита С
- Антигены HIV -1
- Антиген вируса сибирской язвы
- Антиген вируса денге типа I

## ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА

- Фактор роста эпидермиса
- Инсулин
- Инсулиноподобный фактор роста
- Тромбоцитарный фактор роста
- Фактор роста фибробластов
- Интерфероны
- Эритропоэтин
- Соматотропин

# Некоторые генетически модифицированные микроорганизмы, используемые в биотехнологии

- *Bacillus brevis*
- *Bacillus subtilis*
- *Corynebacterium spp.*
- *Erwinia spp.*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas spp.*
- *Streptomyces spp.*
- *Saccharomyces cerevisiae*

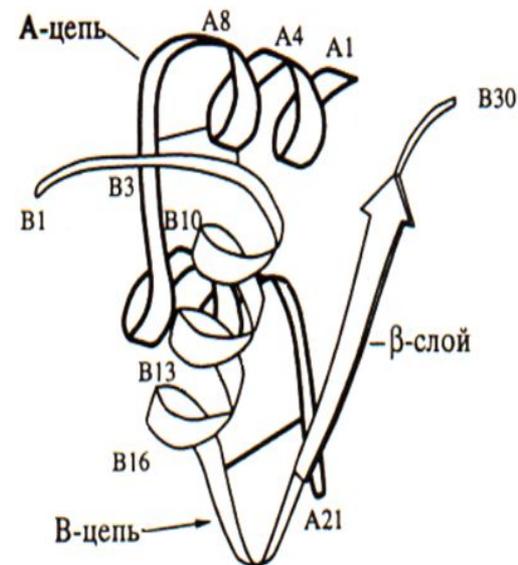
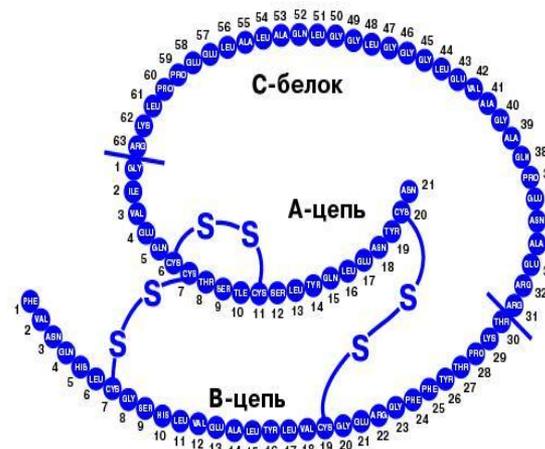
## Рекомбинатный инсулин

На первом месте по объему производства и стоимости продукции рекомбинантного белка как лекарственного средства находится хорошо известный гормон — инсулин, контролирующий уровень глюкозы в крови. Промышленное производство рекомбинантного инсулина было впервые начато в 1982 г. В настоящее время его годовой оборот составляет около одной трети общего оборота всех рекомбинантных белков, используемых в медицине.

Инсулин состоит из двух полипептидных цепей. Цепь *A* содержит 21 аминокислотный остаток, а цепь *B* — 30 аминокислотных остатков. Между собой цепи *A* и *B* связаны двумя дисульфидными ( $— S — S —$ ) связями. Еще одна такая связь имеется между остатками цистеина, находящимися в *A*-цепи. Общая

# Инсулин

- Инсулин - пептидный гормон, выделяемый  $\beta$ -клетками о. Лангенгарса.
- Состоит из двух пептидных цепей: А-цепь - из 21 аминокислотных остатков. В-цепь содержит 30 аминокислотных остатков
- Эти две цепи связаны бисульфидными  $-S-S-$  связями, которые обеспечивают пространственную структуру белка инсулина.
- При синтезе инсулина в поджелудочной железе вначале образуется предшественник инсулина - проинсулин.
- Проинсулин состоит из А-цепи, В-цепи и С-пептида, состоящего из 35 аминокислотных остатков.
- С-пептид отщепляется под действием карбоксипептидазы и трипсина и проинсулин переходит в активный инсулин.
- До получения рекомбинантного инсулина препарат получали из





Традиционный источник инсулина — поджелудочные железы сельскохозяйственных животных — свиней и крупного рогатого скота. Но используется не вся железа, а лишь ткань так называемых «островков Лангерганса».



Российский рынок ежегодно потребляет примерно одну тонну инсулина. Подсчитано, что для получения такого количества инсулина требуется приблизительно **35 млн голов свиней.**



Известно также, что количество лиц, нуждающихся в систематическом введении инсулина, ежегодно возрастает на несколько процентов, поэтому проблема дефицита сырья применительно к инсулину животного происхождения существует до сих пор.

Однако не только этим обстоятельством обусловлен интерес к рекомбинантному инсулину, получаемому путем микробиологического синтеза.

**Инсулин**, выделяемый из поджелудочной железы **свиней**, отличается от инсулина человека на **один аминокислотный остаток**. Инсулин **крупного рогатого скота** — на три. Это означает, что при введении их человеку он получает белок (полипептид) иной видоспецифичности. Следовательно, существует определенный процент случаев проявления аллергии. Также при парентеральном введении (особенно у детей) может наблюдаться болезненность. Одновременно приходится сталкиваться с проблемой передозирования, поскольку в случае аллергии инсулин (как антиген) частично нейтрализуется и, соответственно, вводить его необходимо больше. Кроме того, **предшественник инсулина** при его биосинтезе в животной ткани, так называемый проинсулин, содержит **еще одну полипептидную цепь (пептид С)**. Позднее эта цепь отделяется от зрелой (завершенной) формы гормона, однако при выделении инсулина из животных клеток от примеси проинсулина избавиться трудно. Как раз в пептиде С видовые различия аминокислотной последовательности гораздо более велики (по сравнению с самим инсулином), т.е. побочные эффекты инсулина животного происхождения в значительной степени

Рекомбинантный инсулин, синтезируемый в микробной клетке, лишен указанных недостатков, поскольку аминокислотная последовательность двух его цепей кодируется генами человека. В принципе, он идентичен инсулину из человеческой ткани. Правда, его выделение и очистка требуют особой тщательности, так как в этом случае необходимо освободиться от микробных липо- и гликопротеинов. Их примеси в рекомбинантном инсулине вследствие токсичности могут вызвать нежелательные побочные эффекты. Однако это уже относится к качеству отдельных серий препарата и культуре производства на данном предприятии.

# Способы получения

## инсулина

### 1) модификацией свиного инсулина синтетико-ферментативным методом

Метод основан на том, что свиной инсулин отличается от инсулина человека одной заменой на С-конце В-цепи Ala30Thr. Замену аланина на треонин осуществляют путем катализируемого ферментом отщепления аланина и присоединение вместо него защищенного по карбоксильной группе остатка треонина, присутствующего в реакционной смеси в большом избытке. После отщепления защитной О-трет-бутильной группы получают инсулин человека.

### 2) генно-инженерным способом

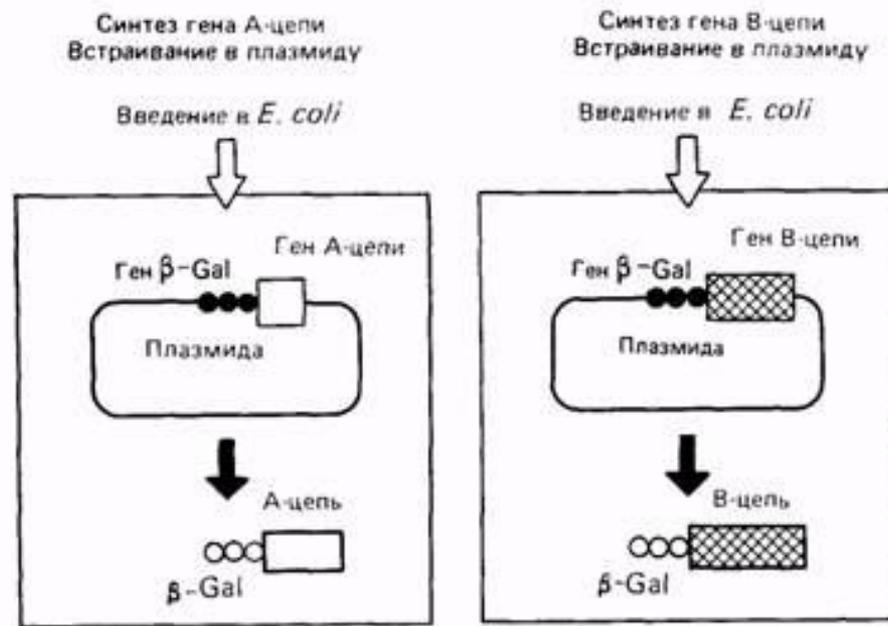
Существует два основных подхода для получения генно-инженерного инсулина человека



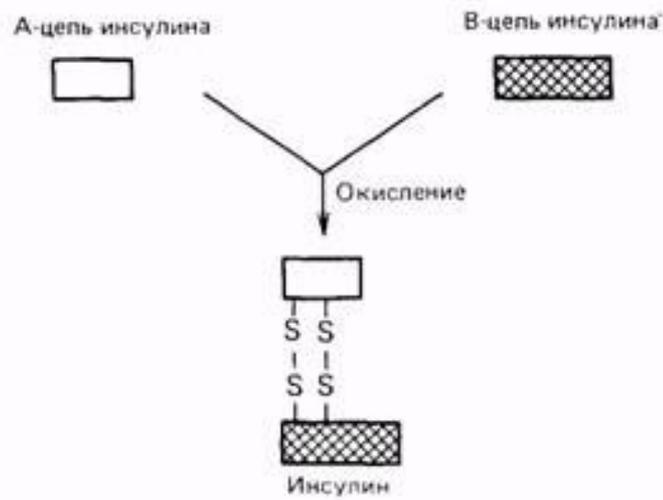
В настоящее время в производстве рекомбинантного (генно-инженерного) инсулина конкурируют **две принципиально разные технологии.**

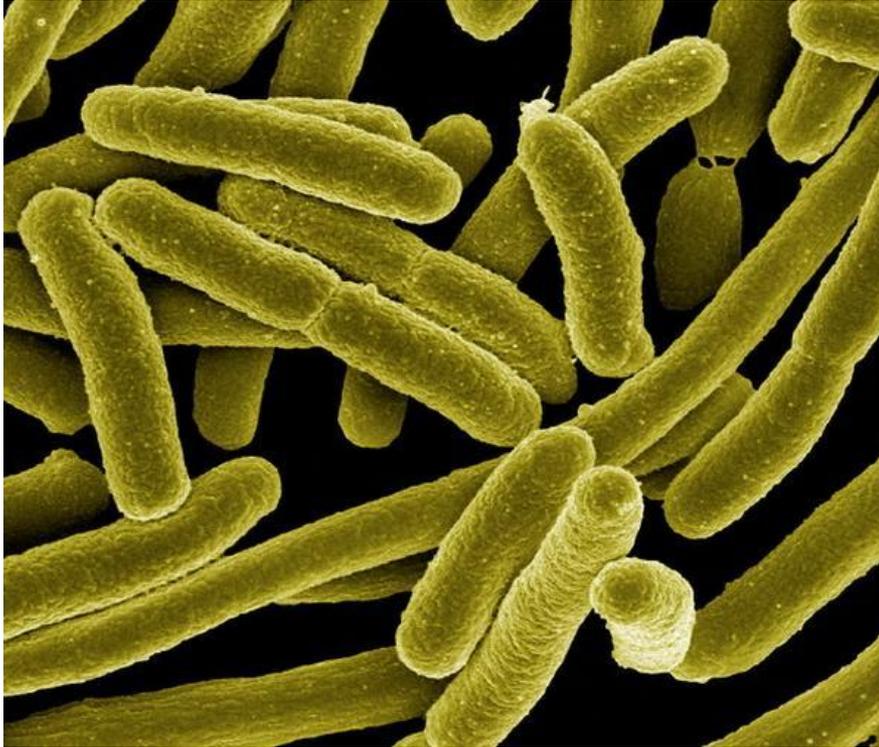
Согласно первой в клетки микроорганизма-хозяина вводят плазмиду, содержащую последовательность нуклеотидов, соответствующую **проинсулину** (цепи А С-пептиду, цепи В и далее лидерному пептиду и промоторному участку). В дальнейшем С-пептид отделяется.

Особенность второй — раздельное получение цепи А и цепи В в двух микробных культурах, которые впоследствии объединяются.



Лизис клеток  
Расщепление бромцианом  
Очистка





**Способ синтеза инсулина человеческого с помощью *E. coli* позволяет получить инсулин более высокого качества и степени очистки с чистотой не ниже 96% и активностью не ниже 26 Е/мг.**

# Преимущества и недостатки рекомбинантного инсулина

«+»:

- Идентичен по составу человеческому инсулину → нет аллергических реакций.
- Более экономичен по сравнению с животным инсулином (1 кг инсулина можно получить в 25 кубовом ферментере, используя кишечную палочку, или необходимо 35 тыс. голов с/х животных).

«-»:

- Тщательный контроль выделения и очистки, т. к. примесь микробных липо- и глико-протеинов, обладают пирогенными свойствами.

# Примеры препаратов инсулина, полученные путем генной инженерии:

- Хумулин Р
- Хумулин-цинк
- Хумулин-Н
- Инсуран Р
- Инсуран НПХ
- Инсуман Комб
- Генсулин М
- и др.



**Инсулин-лекарство для умных, а не дураков.  
Будь то врачи или пациенты.  
Э. П. Джослин (США)**

Все препараты инсулина, выпускаемые мировыми фармацевтическими фирмами, различаются в основном по трем

**основным признакам :**

- 1) по происхождению;
- 2) по скорости наступления эффектов и их продолжительности;
- 3) по способу очистки и степени чистоты препаратов

# • I. По происхождению различают:

- а) **природные** (биосинтетические), естественные, препараты инсулинов, изготавливаемые из поджелудочных желез крупного рогатого скота, например, инсулин ленте GPP, ультраленте МС, а чаще свиней (например, инсулрап СПП, монотард МС, семиленте и др. );
- б) **синтетические** или, более точно, видоспецифические, человеческие инсулины. Эти препараты получают с помощью методов генной инженерии путем ДНК-рекомбинантной технологии, а потому чаще всего их называют ДНК-рекомбинантными препаратами инсулина (актрапид НМ, хомофан, изофан НМ, хумулин, ультратард НМ, монотард НМ и др. ).



## II. По способу очистки и чистоте препаратов различают :

**а) кристаллизованные (плохо очищенные), но не хроматографированные** - это большинство так называемых «традиционных» препаратов инсулина, выпускаемых ранее в нашей стране (инсулин для инъекций), но снятых с производства. Они содержат различные примеси в виде молекул проинсулина, глюкагона, С-пептида (связывающего А и В-цепи проинсулина), соматостатина и других белков. В этих препаратах содержание проинсулина составляет более 10000 частиц на миллион.

**б) кристаллизованные и фильтрованные через гели** – так называемые одно или монопиковые инсулины (актрапид, инсулрап и др. ). Высокоочищенные препараты инсулина (путем фильтрации через гели), называемые монопиковыми, так как на хроматограмме виден только один пик, содержат примесей менее 3000 (от 50 до 3000), а еще более улучшенные - монокомпонентные - менее 10 частиц на миллион частиц инсулина.

**в) кристаллизованные и очищенные посредством "молекулярного сита" и ионообменной хроматографии** - так называемые монокомпонентные инсулины (актрапид МС, семиленте МС, монотард МС, ультраленте МС).

### III. По скорости наступления эффектов и их продолжительности различают :

а) препараты быстрого короткого действия (актрапид МС, актрапид НМ, инсулап, хоморап 40, инсуман рапид и др. ). Начало действия этих препаратов - через 15-30 минут, длительность действия составляет 6-8 часов

б) препараты средней продолжительности действия (начало действия через 1-2 часа, общая продолжительность эффекта - 12-16 часов); - семиленте МС; - хумулин Н, хумулин ленте, хомофан; - ленте, ленте МС, монотард МС (2-4 часа и 20-24 часов соответственно); - илетин I НПХ, илетин II НПХ и др.

в) препараты средней продолжительности в смеси с инсулином короткого действия: (начало действия 30 минут; длительность - от 10 до 24 часов); актрафан НМ; хумулин М-1; М-2; М-3; М-4 (продолжительность действия до 12-16 часов); инсуман комб. 15/85; 25/75; 50/50 (действует в течение 10-16 часов).



г) **препараты длительного действия** : ультраленте, ультраленте МС, ультраленте НМ (до 28 часов); инсулин суперленте СПП (до 28 часов); хумулин ультраленте, ультратард НМ (до 24-28 часов).

д) **инсулины пролонгированного действия**. Наличие в этих препаратах основных белков - протамина и глобина, цинка, а также солевого буфера изменяет скорость наступления сахароснижающего эффекта, время максимального действия, то есть пик действия и общую продолжительность действия. В результате такой смеси получается суспензия, которая медленно всасывается, поддерживая невысокую дозу препарата в крови в течение длительного времени.

Вводятся все эти препараты только подкожно.

**Достоинства пролонгированных препаратов инсулина :**

- 1) препараты вводятся всего два или один раз в сутки;
- 2) препараты имеют высокий рН, что делает их инъекции менее болезненными и инсулин действует быстрее.

**Недостатки :**

- 1) отсутствие физиологического пика, из чего следует, что эти препараты нельзя вводить больным с тяжелой формой сахарного диабета и их следует использовать при относительно легких и среднетяжелых формах;
- 2) препараты категорически нельзя вводить в вену (во избежание гипогликемии);

- **АКТРАПИД НМ**, получаемый из бета-клеток островков поджелудочной железы свиньи, выпускается как официальный препарат во флаконах по 10 мл, чаще всего с активностью по 40 ЕД в 1 мл.
- Вводят его парентерально, чаще всего под кожу. Этот препарат (как и все препараты подгруппы инсулинов быстрого короткого действия) оказывает быстрое сахаропонижающее действие. Эффект развивается через 15-20 минут, а пик действия отмечается через 2-4 часа. Общая продолжительность сахароснижающего влияния - 6-8 часов у взрослых, а у детей до 8-10 часов.
- **Достоинства препаратов инсулина быстрого короткого действия (актрапида) :**
  - 1) действуют быстро;
  - 2) дают физиологический пик концентрации в крови;
  - 3) действуют кратковременно.
- **Основной недостаток** - кратковременность действия, что требует повторных инъекций .



<b>Группа</b>	<b>Разновидности</b>	<b>Начало действия</b>	<b>Пик действия, ч</b>	<b>Длительность действия, ч</b>
Препараты сверхкороткого действия	Лизпро-инсулин	5-10 мин	0.5-2.5	3-4
Препараты короткого действия	Человеческий инсулин короткого действия	30 мин	1-4	5-8
Препараты средней длительности действия	Человеческий инсулин NPH	1-3 ч	6-12	18-26
	Человеческий инсулин ленте	1-3 ч	6-12	18-26
	Человеческий инсулин семиленте	1-3 ч	6-12	18-26
Препараты длительного действия	Человеческий инсулин ультраленте	4-8 ч	14-20	20-36
Комбинированные препараты а	Комбинированный человеческий инсулин	30 мин	Зависит от соотношения компонентов	

# Гормон роста (соматотропин).

В клинике испытан еще один рекомбинантный белок, полученный методом микробиологического синтеза, — гормон роста человека, который секретируется передней долей гипофиза и содержит 191 аминокислотный остаток. В организме человека этот гормон необходим для роста костей. При внутриутробном развитии он не нужен, однако его недостаточность резко проявляется в позднем детском возрасте и приводит к карликовости.

Ген гормона роста человека был клонирован в *E. coli*.

Биологическая

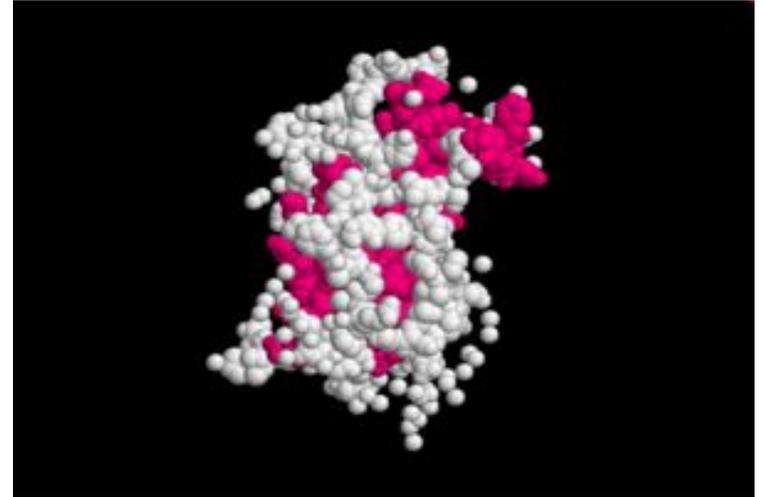
активность выделенного белка была идентична образцу, полученному из гипофиза. Интенсивно ведутся работы по повышению избирательности (уменьшению его связывания

гормона роста  
ром пролактина).



# Соматотропин (Гормон роста)

- Секретируется передней долей гипофиза и содержит 191 аминокислотный остаток.
- В организме человека этот гормон необходим для роста костей.
- Синтез и секреция ГР осуществляются высокоспециализированными **клетками гипофиза** – соматотрофами.
- Регулируется секреция ГР гипоталамическими структурами через рилизинг-гормоны, оказывающие стимулирующий (соматолиберин) или подавляющий (соматостатин) эффект.



До развития генной инженерии соматотропин получали из гипофизов трупов  
С 1980 г. гормон роста человека получают при помощи кишечной палочки

# По способу получения выделяют:

- гомологичные, добываемые из гипофизов трупов;
- синтетические, имеющие в своем составе на одну аминокислоту (метионин) больше, чем человеческий гормон роста;
- рекомбинантные, получаемые с помощью генной инженерии.

# Получение соматотропина

- На первом этапе клонировали двунитевую ДНК-копию мРНК и расщеплением рестрикционными эндонуклеазами получили последовательность, которая кодирует всю аминокислотную последовательность гормона, за исключением первых 23 аминокислот.
- Затем клонировали синтетический полипептид, соответствующий аминокислотам от первой до 23-й.
- Далее два фрагмента объединяли, затем подстроили к паре промоторов и участку связывания рибосом.

Конечный выход гормона составляет 2,4 мг на мл культуры *E. coli* (100000 молекул гормона на клетку).

Рекомбинантный соматотропин, получивший название **соматрем (протропин)**, стал вторым биосинтетическим фармацевтическим препаратом. СТГ, биологически чистый от загрязнений, впервые был получен в 1980 году фирмой “Genetech”. Гормон, синтезированный в генетически сконструированных клетках кишечной палочки, отличается от гормона, выделенного из гипофиза, дополнительным остатком метионина на  $\text{NH}_2$  конце молекулы.

Весь технологический цикл состоит из пяти функционально различных этапов:

1. ферментация
2. первичная очистка белка
3. хроматографическая очистка
4. изготовление лекарственной формы
5. анализ качества субстанции и лекарственной формы соматогена

# Лекарственные формы соматотропина

- Лиофилизат (порошок лиофилизированный, сухое вещество) для приготовления раствора для инъекций (в ампулах, флаконах, картриджах).
- Готовые раствор для инъекций (в картриджах).
- Предварительно заполненная мультидозовая одноразовая шприц-ручка для многократных инъекций.

Биосома;

Генотропин;

Крескормон;

Нордитропин (НордиЛет, ПенСет, Симплекс);

Растан;

Сайзен;

Соматропин;

Хуматроп



## **Терапевтическое действие соматотропина**

- \* проявляет анаболическое действие (стимулирует транспорт аминокислот в клетку и стимулирует синтез белка),
- \* противодействует катаболизму;
- \* стимулирует рост скелета, костей;
- \* вызывает увеличение числа и размера мышечных клеток;
- \* увеличивает массу тела;
- \* вызывает задержку в организме азота, минеральных солей (кальция, фосфора, натрия) и жидкости;
- \* стимулирует абсорбцию кальция из ЖКТ;
- \* стимулирует липолиз, вызывает уменьшение жировых накоплений, уменьшает поступление триглицеридов в жировые депо (особенно чувствительна к соматотропину висцеральная жировая ткань);
- \* вызывает увеличение концентрации жирных кислот в плазме;
- \* повышает содержание сахара в крови (изначально снижает чувствительность к инсулину, которая позже может быть восстановлена или даже улучшена вследствие благоприятных эффектов гормона роста на

# Рекомбинантные белковые факторы врожденного иммунитета.

К числу используемых в качестве лекарственных средств видоспецифичных белков относятся интерфероны - факторы врожденного иммунитета. Это группа белковых веществ, вырабатываемых зараженными вирусами. Они индуцируют локальные и системные противовирусные реакции в других клетках, и, соответственно, используются как противовирусные препараты. До недавнего времени интерфероны из человеческих клеток были доступны лишь в малых количествах. Как медицинский препарат использовался лейкоцитарный интерферон. Его источником служила кровь, получаемая из родильных домов. В настоящее время ген лейкоцитарного интерферона получен путем химического синтеза. Затем он был включен в плазмиды, которые в свою очередь, были введены в клетки кишечной палочки и клетки дрожжей, ставшие таким образом продуцентами лейкоцитарного интерферона человека

# Рекомбинантные белковые факторы врожденного иммунитета

**Интерферон** – полипептид, вырабатывающийся и аккумулирующийся во всех ядродержащих клетках крови и эпителиальных клетках слизистых оболочек. Он является основным звеном противoinфекционной защиты человека. Интерфероны вырабатываются и выделяются местно, в окологклеточное пространство. Действуют преимущественно на близлежащие клетки.

**Интерфероны** - общее название, под которым в настоящее время объединяют ряд белков со сходными свойствами, выделяемые клетками организма в ответ на вторжение вируса. Благодаря интерферонам клетки становятся невосприимчивыми по отношению к вирусу. «Определяемый в качестве интерферона фактор должен быть белковой природы, обладать антивирусной активностью по отношению к разным вирусам, по крайней мере, в гомологичных клетках, опосредованной клеточными метаболическими процессами, включающими синтез РНК и белка».

# Строение интерферона

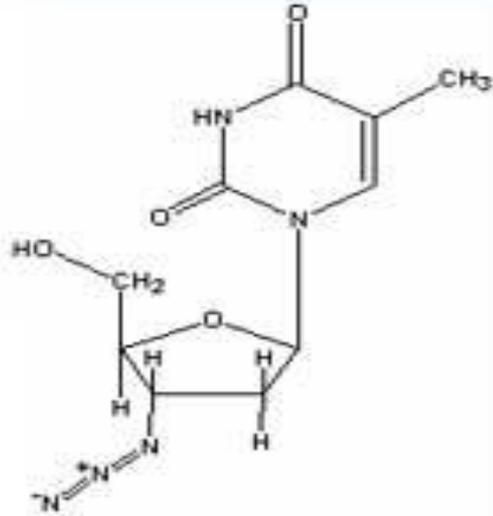


Рис 1. Химическая формула интерферона

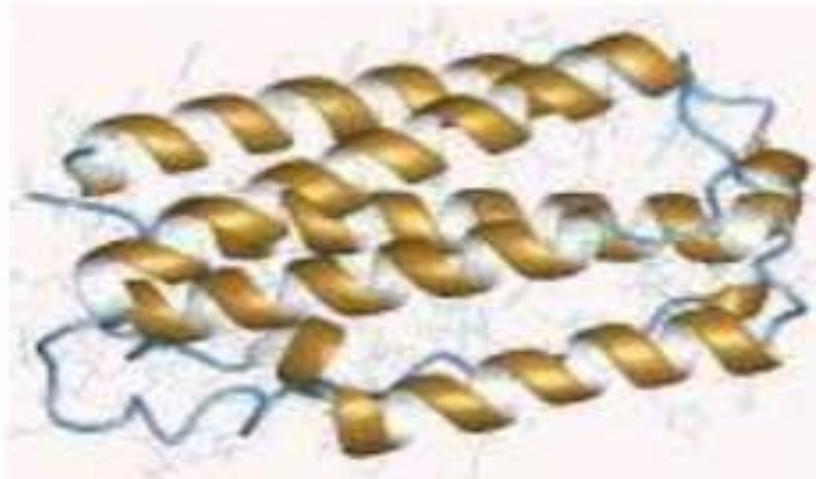


Рис 2. Модель строения интерферона

# Классификация интерферонов

Лейкоцитарные интерфероны, в зависимости от типа клеток в которых они образуются, подразделяются на:

- 1.L-группа (лейкоцитарный интерферон)
- 2.B-группа (интерфероны фибробластов)
- 3.G-группа (иммунный интерферон Т-лимфоциты)

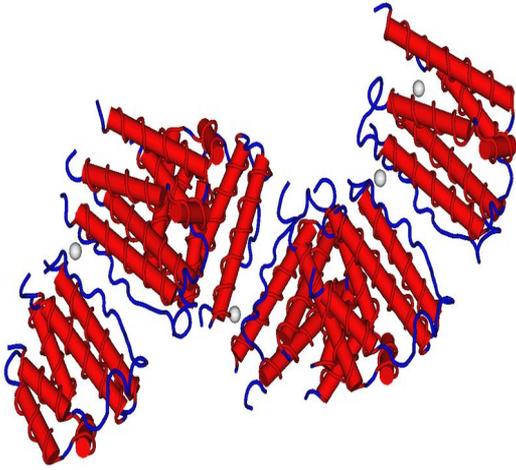
Или по-другому:

- **альфа** (alpha) - вырабатывается лейкоцитами,
- **бета** (beta) - вырабатывается фибробластами, и
- **гамма** (gamma) - вырабатывается лимфоцитами.

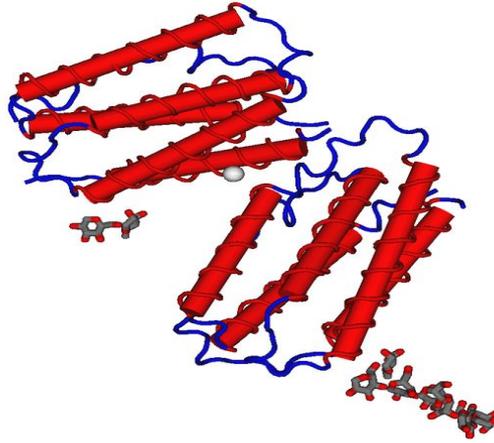
Все они не только обладают антивирусным и противоопухолевым действием, но что важнее, обладают свойством активировать - понуждать к действию такие клетки иммунной системы, как макрофаги.



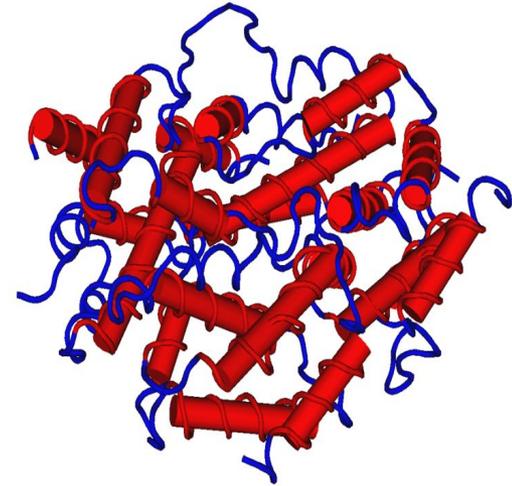
# Пространственная структура интерферонов



Человеческий  
интерферон- $\alpha$



Человеческий  
интерферон- $\beta$



Человеческий  
интерферон- $\gamma$

# Основные эффекты интерферонов:

- **Противовирусный:** подавление синтеза вирусной РНК, подавление синтеза белков оболочки вируса.
- **Иммуномодулирующий** – способность интерферонов регулировать взаимодействие клеток участвующих в иммунном ответе.
- **Противоопухолевый** эффект интерферонов связан с их способностью активировать цитотоксические лимфоциты, модулировать продукцию антител, подавлять действие опухолевых ростовых факторов.
- **Антипролиферативный** эффект заключается в способности интерферонов проявлять свойства цитостатиков – подавлять рост клеток за счет ингибирования факторов стимулирующих пролиферацию клеток.
- **Подавление вирусной инфекции**



**По способу получения интерфероны делятся на:**

**1.Природные:**

получаемые из культуры клеток лейкоцитов человека, стимулированных вирусами.

**2.Рекомбинантные:**

получают генно-инженерным методом путем культивирования бактериальных штаммов, содержащих в своем генетическом аппарате встроенную рекомбинантную плазмиду гена интерферона человека.

***Технология получения интерферона***

1. Культивирование рекомбинантного штамма E.coli,
2. Замораживание полученной биомассы при температуре не выше  $-70^{\circ}\text{C}$ ,
3. Размораживание,
4. Разрушение клеток микроорганизма лизоцимом,
5. Удаление ДНК и РНК, введение в лизат ДНК-азы и очистка выделенной нерастворимой формы интерферона, отмывка буферным раствором с детергентами,
6. Растворение осадка интерферона в растворе гуанидин гидрохлорида,
7. Ренатурация и одностадийная очистка ионообменной

**Технологическая схема** получения генно-инженерных интерферонов (как одна из возможных) принципиально сводится к следующему:

1. Индукция синтеза и выделение интерфероновой мРНК из клеток;
2. Получение кДНК, комплементарной интерфероновой мРНК из лейкоцитов;
3. Встраивание кДНК в плазмиду;
4. Введение реконструированной плазмиды в клетки *E.coli*;
5. Размножении бактерий, содержащих реконструированную плазмиду, в культуральной среде;
6. Сепарирование клеток *E.coli*;
7. Дезинтеграция и экстракция клеток *E.coli*;
8. Осаждение (например, полиэтиленамином) с последующим центрифугированием;
9. Высаливание интерферона из супернатанта аммония сульфатом;
10. Диализ осадка интерферона;
11. Растворение интерферона, пропусканием раствора через колонку с иммуносорбентом (пришитыми моноклональными антителами);
12. Элюция интерферона с последующей хроматографией на целлюлозном катионообменнике.

Из указанных стадий, только 8 последних фактически реализуются в производственных условиях, тогда как первые 4 стадии выполняются в лабораторных условиях. Именно эти первые 4 этапа являются наиболее трудными и сложными.

## Основные представители.

# ПРЕПАРАТЫ РЕКОМБИНАНТНОГО АЛЬФА-ИНТЕРФЕРОНА



## Виферон

Состоит из человеческого рекомбинантного интерферона  $\alpha 2\beta$ ,  $\alpha$ -токоферола ацетата (витамин Е), аскорбиновой кислоты (витамин С), масла какао.

Виферон обладает иммуномодулирующим ( **стимулирует фагоцитарную активность нейтрофилов в очагах поражения** ) , противовирусным и противоопухолевым действием.

### Показания к применению:

- у беременных: ОРВИ, негоспитальная атипичная пневмония, пиелонефрит, гломерулонефрит, вирусные гепатиты В, С;
- у новорожденных (недоношенных детей): ОРВИ, атипичная пневмония, сепсис, цитомегалия, гепатит, кишечный дисбактериоз, энтеровирусные инфекции, менингит;
- для лечения онкологических заболеваний: волосато-клеточный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, лимфогрануломатоз, неходжкинская лимфома, солидные опухоли;
- для лечения острых и хронических вирусных гепатитов В, С и Д;
- для лечения герпеса, уреаплазмоза, хламидиоза, микоплазмоза, цитомегаловирусной инфекции, трихомониаз, гарднереллез, папилломавирусная инфекция, бактериальный вагиноз, рецидивизирующий влагалищный кандидоз;
- бронхиальная астма;
- гнойно-септические состояния.

# ПРЕПАРАТЫ РЕКОМБИНАНТНОГО АЛЬФА-ИНТЕРФЕРОНА

## Реаферон

Состоит из человеческого рекомбинантного интерферона  $\alpha 2\beta$ , стабилизированного человеческим сывороточным альбумином.

**Форма выпуска:** ампулы с лиофилизированным порошком по  $1 \times 10^5$  МЕ

Обладает иммуномодулирующим, противовирусным и противоопухолевым действием.

**Противопоказания:** беременность, аллергические заболевания.

## Гриппферон

Состоит из человеческого рекомбинантного интерферона  $\alpha 2$ .

**Форма выпуска :** капли в нос во флаконе-капельнице по 5,0 и 10,0 мл.

Обладает иммуномодулирующим, противовирусным, противомикробным и противовоспалительным действием.

**Показания к применению:** профилактика и лечение ОРВИ и гриппа.



# Препараты рекомбинантного интерферона - альфа



- **Виферон**  
Состав: человеческого рекомбинантный интерферон  $\alpha$ -2 $\beta$ ,  $\alpha$ -токоферол ацетат (витамин E), аскорбиновая кислота (витамин C), масло какао.  
Показания к применению и противопоказания: согласно инструкции.  
Формы выпуска: суппозитории по 15000 ME, 500000 ME, 1000000 ME, 3000000 ME; мазь, содерж. 40000 ME интерферона на 1 г; гель, содерж. 36000ME интерферона на 1г.

## Лекарственные формы интерферона- $\beta$

Существует 2 типа бета-интерферона, используемых в медицине - это бета-интерферон-1б и бета-интерферон-1а.

	бета-интерферон-1б	бета-интерферон-1а
Торговые наименования	Авонекс Ребиф Генфаксон	Бетаферон Интерферон бета – 1b человеческий рекомбинантный Ронбентал Экставия

Однако, учитывая отсутствие согласованности в методах определения биологической активности интерферонов, прямое сравнение активности различных препаратов затруднено.

В настоящее время интерферон-бета выпускается в следующих формах:

- Сухое вещество для инъекций 1 млн. МЕ во флаконах в упаковке по 3 шт. + физиологический раствор в ампулах по 1 мл в упаковке по 3 шт.
- Сухое вещество для инъекции 3 млн. МЕ во флаконах в упаковке по 1 и 3 шт. + физиологический раствор в ампулах по 2 мл в упаковке по 1 и 3 шт.
- Сухое вещество для приготовления глазных капель 600 000 МЕ во флаконах; растворитель 1,2 мл в шприце - по 3 флакона с активным веществом, по 3 шприца с растворителем и по 3 пипетки-капельницы в упаковке.
- Мазь 500 000 МЕ в шприце, 5 г.

## Технология получения интерферона - $\beta$

Оба вида интерферона –  $\beta$  в настоящее время получают методом рекомбинантного синтеза на основе ДНК человека. Интерфероны-бета-1а нарабатываются в культуре клеток яичника китайского хомячка, а интерферон-бета-1б - в культуре бактериальных клеток (*E. Coli*).



# Контроль качества

Интерферон-бета подвергают следующим видам контроля:

- физическому
- полному химическому
- биологическому
- контролю на пирогенность
- испытаниям на механические включения
- испытаниям на токсичность.

# ПРЕПАРАТЫ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕТА-ИНТЕРФЕРОНА

## Бетаферон

Рекомбинантный интерферон бета -  
1 $\beta$

**Форма выпуска:** флаконы по 9,6 MIU

Обладает противовирусным и  
противоопухолевым действием.

**Противопоказания:** беременность,  
повышенная чувствительность,  
эпилепсия, заболевания печени



# Интерферон (ИНФ) - $\gamma$

- **ИНФ- $\gamma$**  - гликопротеин с молекулярной массой 20–25 кДа
- два типа **ИНФ- $\gamma$** : 1а и 2а, различаются последовательностью аминокислот в своей цепочке в 1 и 139 положении.
- выраженное действие – иммуномодулирующее (индуктор клеточного звена иммунитета);
- Противовирусные и противоопухолевые свойства выражены слабее чем у **ИНФ- $\alpha$**  и **ИНФ- $\beta$** ;
- Ген **ИНФ- $\gamma$**  расположен в 12 хромосоме;
- основные клетки-продуценты - Т-лимфоциты и натуральные или естественные киллеры (**НК-клетки**);
- Индуцирующий сигнал для выработки интерферона - любой антиген или другие цитокины.

# Препараты рекомбинантного интерферона - гамма



## • Анаферон

Состав: рекомбинантний інтерферон-гамма.

Форма випуска : таблетки по 3 гр.

Фармакологічне действие: імуномодулююче і протівовірусне.

Показание к применению: профілактика і лічення грипу і ОРВІ.

Противопоказання: індивідуальна непереносимість.

# «Ингарон»

- Содержит в качестве активного вещества рекомбинантный интерферон гамма человека, который состоит из 144 аминокислотных остатков, лишен первых трех аминокислотных остатков (Cys-Tyr-Cys), замененных на Met. Молекулярная масса 16,9 кДа.



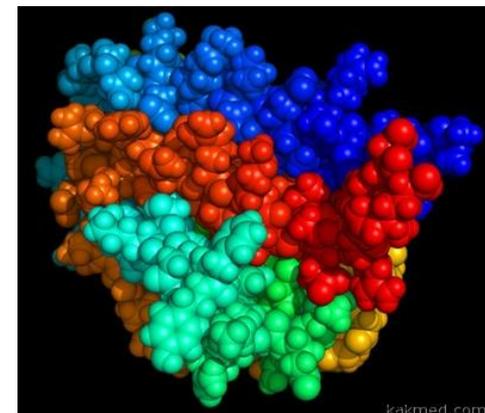
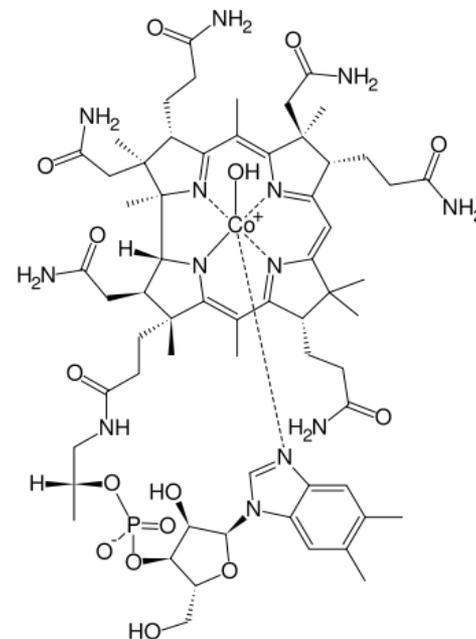
## ЭРИТРОПОЭТИН

Эритропоэтин (ЭПО) -гемопоэтический фактор роста, гликопротеин со свойствами гормона, физиологическая роль которого состоит в регуляции продукции эритроцитов в зависимости от потребности организма в кислороде. ЭПО специфически усиливает пролиферацию и дифференцировку ранних клеток - предшественников эритропоэза, на поздних стадиях эритропоэза гормон стимулирует синтез гемоглобина и созревание эритроцитов. Основным местом синтеза ЭПО у взрослого человека являются почки, около 10% продукции гормона приходится на клетки печени. Уровень эндогенного ЭПО в сыворотке крови здоровых людей широко варьирует и находится в обратной зависимости от концентрации гемоглобина и степени оксигенации тканей. Продукция ЭПО закономерно повышается при гипоксии на фоне постгеморрагической анемии, вследствие падения напряжения кислорода в артериальной крови или при повышении сродства гемоглобина к кислороду. С помощью методов генной инженерии получен высокоочищенный рекомбинантный человеческий ЭПО (рчЭПО) в виде лекарственного препарата.

Способ получения рекомбинантного эритропоэтина имеет важную особенность - ген эритропоэтина человека встраивается не в микробные, а в **животные клетки (яйцеклетки китайского хомячка)**, где белок может быть гликолизирован. При этом, продуцентом

# Эритропоэтин

- Эритропоэтин (ЭПО) - гемопоэтический фактор роста, гликопротеин со свойствами гормона, физиологическая роль которого состоит в регуляции продукции эритроцитов в зависимости от потребности организма в кислороде.



# Способ получения

- Способ получения рекомбинантного эритропоэтина имеет важную особенность - ген эритропоэтина человека встраивается не в микробные, а в животные клетки (яйцеклетки китайского хомячка), где белок может быть гликолизирован. При этом, продуцентом эритропоэтина является монослойная культура этих клеток.



# Выделение эритропоэтина с применением методов генной инженерии

- Во всех случаях получение эритропоэтина ограничивается трудностями, связанными с выделением и культивированием клеток, нестабильностью продукции гормона и, наконец, низкой концентрацией его в культуральных жидкостях.
- Принципиально иной подход к получению больших количеств высоко очищенного эритропоэтина был связан с применением методов генной и клеточной инженерии.
  1. Попытка создания бактериального продуцента ЭПО.
  2. Получение ЭПО на основе клеток насекомых.
  3. Получение ЭПО продуцируемого трансфицированными клетками.
  4. Получение высокоэффективного продуцента ЭПО трансфицированными клетками.

- Исследование механизмов взаимодействия эритропоэтина с клетками- мишенями долгое время было невозможно из-за отсутствия радиоактивно меченого эритропоэтина, сохраняющего биологическую активность ( [Goldwasser E., 1981](#) ). Эта проблема было решена благодаря получению рекомбинантного эритропоэтина. Меченый эритропоэтин получают несколькими способами:
- 1) мечение тритием по углеродной части ( [Krantz S., Goldwasser E., 1984](#) );
- 2) иодирование ( [Sawyer S. et al., 1987](#) , [Todokoro K. et al., 1987](#) );
- 3) включение меченных радиоактивной серой аминокислот в процессе биосинтеза рекомбинантного эритропоэтина в трансфецированных клетках ( [Mufson P., Gesner T., 1987](#) )

# Лекарственные формы эритропоэтина и технология их получения.

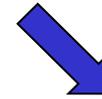
Активное-действующее вещество / начало: эритропоэтин



эпоэтин альфа



эпоэтин бета



эпоэтин омега

- эпоэтин альфа: **Рэпоэтин-СП; Эпокомб; Эпокрин; Эпрекс; Эральфон.**
- эпоэтин бета: **Веро-эпоэтин; Рекормон; Эпостим; Эпоэтин; Эпоэтин-веро; Эритропоэтин; Эритростим.**
- эпоэтин омега: **Эпомакс.**



Все лекарственные препараты выпускаются в виде раствора для инъекций.

ЭПО стандартизирован по единицам активности (МЕ) и измеряется в МЕ и/или мг.



# Задачи для создания препарата ЭПО:

↙  
стабильность  
при хранении

↓  
сохранение  
in vivo  
активности

↓  
не адсорбироваться  
на стенках ампул  
или шприцов

↘  
легко переводиться в  
инъекционную форму



## **Поставленные задачи решались комбинацией различных компонентов:**

- Для стабилизации добавка мочевины и различных аминокислот
- Для создания нужной рН области добавляют физиологически совместимый буфер
- Адсорбирование ЭПО к стенкам ампул и шприцов снижается за счет добавления незначительных количеств детергента
- В качестве растворителя используют воду для инъекций с добавлением хлорида натрия для установления изотонии

## **Получение препарата:**

- Вспомогательные вещества растворяют в необходимом количестве воды и примешивают ЭПО-препарат
- Стерильно фильтруют в соответствующие ампулы
- Замораживают
- Осторожно лиофилизируют при низких температурах

# Генно-инженерные (рекомбинантные вакцины).

**Генно-инженерные вакцины** содержат антигены возбудителей, полученные с использованием методов генной инженерии, и включают только высокоиммуногенные компоненты, способствующие формированию защитного иммунитета.

Возможны несколько вариантов создания генно-инженерных вакцин:

- Внесение генов вирулентности в авирулентные или слабовирулентные микроорганизмы.
- Внесение генов вирулентности в неродственные микроорганизмы с последующим выделением Аг и его использованием в качестве иммуногена.
- Искусственное удаление генов вирулентности и использование модифицированных организмов в виде корпускулярных вакцин.

Иммунобиотехнология основана на реакции антиген (АГ)- антитело (АТ). В качестве примера иммунобиотехнологического генного процесса может служить получение вируса полиомиелита из культуры ткани живого человека для получения вакцины.

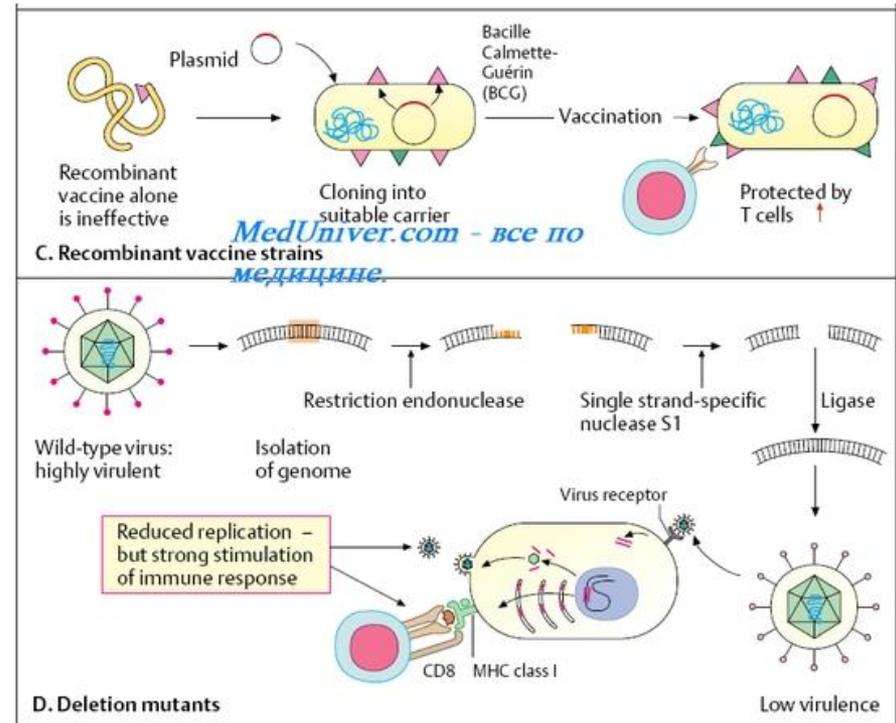
Биопродукты (вакцины) должны проходить тщательную проверку

# Варианты создания рекомбинантных вакцин

- Внесение генов вирулентности в авирулентные или слабовирулентные микроорганизмы.

- Внесение генов вирулентности в неродственные микроорганизмы с последующим выделением Аг и его использованием в качестве иммуногена.

- Искусственное удаление генов вирулентности и использование модифицированных организмов в виде корпускулярных вакцин.



# Вакцины

**Вакцины** – это препараты, приготовленные из убитых или ослабленных болезнетворных микроорганизмов или их токсинов. Как известно, вакцины применяются с целью профилактики или лечения. Введение вакцин вызывает иммунную реакцию, за которой следует приобретение устойчивости организма человека или животного к патогенным микроорганизмам.

Если рассмотреть **состав вакцины**, то в них входят:

- действующий компонент, представляющие специфические антигены,
- консервант, который продлевает срок годности вакцины,
- стабилизатор, который определяет стабильность вакцины при ее хранении,
- полимерный носитель, который повышает иммуногенность антигена (АГ).

Под **иммуногенностью** понимают свойство антигена вызывать иммунный ответ.

В роли **антигена** можно использовать:

1. живые ослабевшие микроорганизмы
2. неживые, убитые микробные клетки или вирусные частицы
3. антигенные структуры, извлеченные из микроорганизма
4. продукты жизнедеятельности микроорганизмов, в качестве которых используют токсины, как вторичные метаболиты.

# **Классификация вакцин в соответствии с природой специфического антигена:**

- **живые**
- **неживые**
- **комбинированные.**

## 1. Живые вакцины получают

а) из естественных штаммов микроорганизмов с ослабленной вирулентностью для человека, но содержащий полный набор антигенов (в качестве примера можно привести вирус оспы).

б) из искусственных ослабленных штаммов.

в) часть вакцин получают генноинженерным способом (векторные вакцины). Для получения таких вакцин используют штамм, несущий ген чужеродного антигена, например, вирус оспы со встроенным антигеном гепатита В.

## Векторные вакцины

Ряд современных противовирусных вакцин сконструирован путём введения генов, кодирующих основные Аг патогенных вирусов и бактерий, в геном вируса осповакцины (HBsAg вируса гепатита В (ПОВЕРХНОСТНЫЙ АНТИГЕН **ВИРУСА** ГЕПАТИТА В (Hepatitis B surface antigen - **HBsAg**) - антиген, составляющий наружную оболочку **вируса** гепатита В (ВГВ).) и непатогенных для человека сальмонелл (HBsAg вируса гепатита В и Аг токсина столбнячной палочки). Другим примером служит введение генов возбудителя туберкулёза в вакцинный штамм БЦЖ, что придаёт ему большую активность в качестве дивергентной вакцины. Такие препараты известны как **векторные вакцины**.

## 2. Неживые вакцины :

а) молекулярные и химические вакцины. При этом молекулярные вакцины конструируют на основе специфического антигена, который находится в молекулярном виде. Эти вакцины могут быть получены и путем химического синтеза или биосинтеза. Примерами молекулярных вакцин являются **анатоксины**. Анатоксины – это бактериальный экзотоксин, потерявший токсичность в результате длительного воздействия формалина, но сохранивший антигенные свойства. Это **дифтерийный токсин, столбнячный токсин, бутулинический токсин**.

б) корпускулярные вакцины, которые получают из целой микробной клетки, которая инактивирована температурой, ультрафиолетовым облучением или

### 3. Комбинированные вакцины.

Они комбинируются из отдельных вакцин, превращаясь при этом в **поливакцины**, которые способны иммунизировать сразу от нескольких инфекций. В качестве примера можно назвать поливакцину АКДС, содержащую дифтерийный и столбнячный анатоксины и коклюшные корпускулярные антигены. Эта вакцина, как известно, широко применяется в детской практике.

**Токсины** как продукты  
жизнедеятельности  
микроорганизмов: **ЭКЗОТОКСИНЫ** И  
**ЭНДОТОКСИНЫ**



1 группа токсинов – это **ЭКЗОТОКСИНЫ**:

экзотоксины – это белковые вещества, выделяемые клетками бактерий во внешнюю среду. Они в значительной степени определяют болезнетворность микроорганизмов.

Экзотоксины в своем строении имеют **два центра**. Один из них фиксирует молекулу токсина на соответствующем клеточном рецепторе, второй – токсический фрагмент – проникает внутрь клетки, где блокирует жизненно важные метаболические реакции. Экзотоксины могут быть термолабильны или термостабильны. Известно, что под действием формалина они теряют токсичность, но сохраняют при этом иммуногенные свойства – такие токсины называются **анатоксинами**.

2 группа токсинов – это **ЭНДОТОКСИНЫ**.

Эндотоксины являются структурными компонентами бактерий, представляя липополисахариды клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Эндотоксины менее токсичны, разрушаются при нагревании до 60-80<sup>0</sup>С в течении 20 минут. Эндотоксины выходят из клетки бактерий при ее разложении. При введении в организм эндотоксины вызывают иммунный ответ. Получают сыворотку путем иммунизации животных чистым эндотоксином. Однако эндотоксины - относительно слабый иммуноген и сыворотка не может обладать высокой антитоксической активностью.

# Получение вакцин

## 1. вакцины живые

**1.1. живые бактериальные вакцины.** Этот тип вакцин получается наиболее просто. В ферментере выращиваются чистые ослабленные культуры.

Существует 4 основных стадии получения живых бактериальных вакцин:

- выращивание
- стабилизация
- стандартизация
- лиофильное высушивание.

В этих случаях штаммы продуцентов выращиваются на жидкой питательной среде в ферментере вместимостью до 1-2 м<sup>3</sup>.

**1.2. живые вирусные вакцины.** В этом случае вакцины получают путем культивирования штамма в курином эмбрионе или в культурах животных клеток.

**2. молекулярные вакцины.** Чтобы иметь представление об этом типе вакцин, надо знать, что в этом случае из микробной массы выделяют специфический антиген или экзотоксины. Их очищают, концентрируют. Затем токсины обезвреживают и получают **анатоксины**. Очень важно, что специфический антиген может быть также получен путем химического или биохимического синтеза.

**3. Корпускулярные вакцины.** Их можно получить из микробных клеток, которые предварительно культивируют в ферментере. Затем микробные клетки инактивируют температурой, или ультрафиолетовым облучением (УФ), или химическими веществами (фенолами или спиртом).

# Сыворотки

## *Применение сывороток*

1. Сыворотки широко используются в случаях профилактики и лечения инфекционных заболеваний.
2. Сыворотки также используются при отравлении ядами микробов или животных – при столбняке, ботулизме дифтерии (для инактивации экзотоксинов), применяются сыворотки и от яда кобры, гадюки и др.
3. Сыворотки могут быть использованы и для диагностических целей, для создания различных диагностических наборов (например в тестах на определение беременности). В этом случае антитела используются в реакциях образования комплексов с антигенами (антиген (АГ) – антитело (АТ)), когда происходит подтверждение наличия соответствующих антигенов, что может быть использовано в различных реакциях.

Профилактическое или лечебное действие сывороток основано на содержащихся в сыворотке антителах (АТ).

Для **массового получения сыворотки** вакцинируют ослов, лошадей.

### Введение

такой сыворотки дает образование пассивного иммунитета, то есть организм получает готовые антитела. Сыворотки, которые получают путем иммунизации животных, должны быть на контроле по такому показателю, как **титр антител** у животных, чтобы брать у них кровь в период максимального содержания антител. Из крови животных выделяют плазму крови, затем из плазмы удаляют фибрин и получают сыворотку. Это один способ получения сыворотки.

# Цитокины как основа для получения новых лекарственных средств

Одним из важнейших путей усовершенствования лекарственных средств является использование новых ранее неиспользуемых (или неизвестных) групп биологически активных веществ. К числу таких веществ, безусловно, относятся различные цитокины. Следует отметить, что попытки использования генно-инженерных цитокинов в клинической практике продолжают уже в течение последних 10-15 лет.

**Цитокины представляют собой пептиды или гликопротеиды с молекулярной массой от 6 до 60 кДа. Они действуют как гуморальные регуляторы в пиколярных и наномолярных концентрациях, модулируя при нормальных или патологических состояниях организма функциональную активность индивидуальных клеток и тканей.** Спектр действия цитокинов гораздо шире, чем у пептидных гормонов, так как они взаимодействуют с большим числом различных клеток, не проявляя при этом антигенной специфичности. К наиболее важным биологическим свойствам цитокинов относят:

- **индуцибельность** - продукция цитокинов осуществляется в ответ на действие стимулирующих факторов;
- **локальность действия;**
- **избыточность** – каждый тип клеток может вырабатывать несколько цитокинов, а каждый цитокин может продуцироваться несколькими типами клеток;
- **взаимосвязь и взаимодействие** – *одни цитокины могут индуцировать*

# Структурно-функциональная классификация и классификация цитокинов по строению.

- К цитокинам относят:
  1. Интерфероны (IFN);
  2. Колонiestимулирующие факторы (CSF);
  3. Хемокины;
  4. Трансформирующие ростовые факторы (TGF);
  5. Факторы некроза опухолей (TNF);
  6. Интерлейкины (IL).

Группа	Особенности строения	Цитокины
1	$\alpha$ -спиральные тяжи, короткая цепь	ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-7, ИЛ-9, ИЛ-13, ИЛ-15, IFN $\gamma$ , M-CSF, GM-CSF
	$\alpha$ -спиральные тяжи, длинная цепь	ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-11, Oncostatin M
2	$\beta$ -складчатые структуры, длинная цепь	Семейства ФНО, ИЛ-1, TGF $\beta$
3	$\alpha/\beta$ короткая цепь	Хемокины
4	Смешанные мозаичные структуры	ИЛ-12

# Классификация цитокинов по биологическим функциям

Интерфероны 1-го типа	IFN $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ , $\kappa$ , $\omega$ , $\tau$ ; IL-28, 29	Противовирусная активность, антипролиферативное иммуномодулирующее действие
Факторы роста гемопоэтических клеток	Фактор роста стволовых клеток; IL-3, 7, 11; эритропоэтин, тромбопоэтин и т.д.	Стимуляция пролиферации и дифференцировки предшественников различных типов лейкоцитов
Семейство интерлейкина-1	IL-1 $\alpha$ , $\beta$ ; рецепторный антагонист; IL-1, 18; фактор роста фибробластов	Провоспалительное действие, активация специфического иммунитета
Семейство фактора некроза опухолей	TNF (18 разновидностей)	Провоспалительное действие, регуляция апоптоза и межклеточного взаимодействия иммунокомпетентных клеток
Семейство интерлейкина-6	IL-1, 11, 31; онкостатин-M; кардиотропин-1 и т.д.	Иммунорегуляторное действие
Хемокины	46 разновидностей	Регуляция хемотаксиса различных типов лейкоцитов
Семейство интерлейкина-10	IL-10, 19, 20, 22, 24, 26	Иммуносупрессивное действие
Семейство интерлейкина-12	IL-12, 23, 27	Регуляция дифференцировки Т-лимфоцитов
Цитокины Т-хелперных клонов	Th1 — IL-2, 15, 21; TNF; IFN $\gamma$	Активация клеточного иммунитета
	Th2 — IL-4, 5, 10, 13, 25	Активация гуморального иммунитета
Семейство интерлейкина-17	IL-17A, B, C, D, E, F	Активация синтеза провоспалительных цитокинов
Семейство трансформирующих ростовых факторов	TGF $\beta$ , Bone mar. factor и т.д.	Регуляция воспаления и регенерации тканей

# Препараты цитокинов

- 1) **Естественные:** Лейкинферон, Суперлимф — содержат широкий спектр цитокинов. Влияют на клетки-эффекторы врожденного иммунитета. Обладают антиоксидантной активностью, прямым противовирусным и антибактериальным эффектом.
- 2) **Рекомбинантные:**
  - **РОНКОЛЕЙКИН (IL-2).** Активатор и индуктор Т-, В-, НК-клеток. Через выработку соответствующих цитокинов влияет на:
    1. Усиление цитотоксической активности CD8 Т-лимфоцитов
    2. Усиление пролиферации В-лимфоцитов в плазматические клетки с последующей активацией выработки иммуноглобулинов.
    3. Повышение функциональной активности антигенпрезентирующих клеток.

# Препараты цитокинов:

- **БЕТАЛЕЙКИН (IL-1b)**

- 1) Активация всех клеток врожденного иммунитета.
- 2) Инициация первых фаз врожденного иммунитета.
- 3) Активация клеточного иммунитета (повышение продукции IFN $\gamma$ , IL-2, CSF, усиление пролиферации лимфоцитов и функциональной активности NK-клеток).

- Препараты интерферонов

- 1) Естественные: интерферон (лейкоцитарный интерферон из донорской крови человека).
- 2) Рекомбинантные: реальдирон, интрон, реаферон, роферон-А, бетаферон, виферон.

- Препараты индукторов интерферонов:

- 1) Синтетические: Камедон, Амексин, Арбидол, Циклоферон, Неовир, Курантил.
- 2) Природные: Ларифан, Ридостин, Кагоцел, Рагосин, Гозалидон, Саврац, Мегасин.

# Препараты цитокинов:

- Основное свойство всех этих препаратов — противовирусный эффект.
- Все вышеперечисленные препараты применяются при недостаточной выработке эндогенных цитокинов. В случае их гиперпродукции используется антицитокиновая терапия в виде блокировки их избыточного синтеза (естественные ингибиторы, моноклональные антитела).



## Группы цитокинов:

- интерлейкины, участвующие в процессах взаимодействия лейкоцитов;
- интерфероны, обладающие противовирусной активностью;
- факторы некроза опухолей;
- колониестимулирующие факторы – гемопозитические цитокины, действующие на кроветворные клетки, начиная с уровня стволовых;
- хемокины – хемотаксические цитокины, участвующие в иммунных и воспалительных реакциях;
- **факторы роста, модулирующие рост и дифференцировку клеток.**

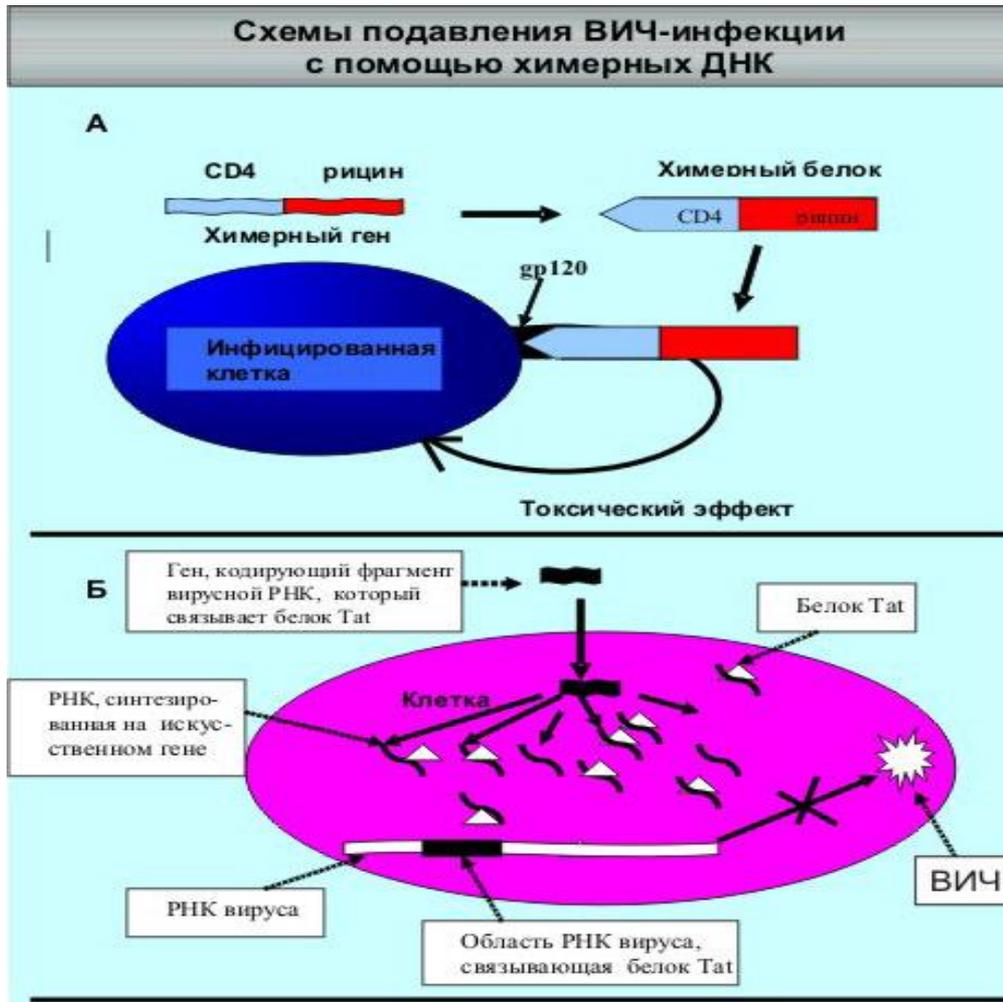
К последней группе относится **ЭФР** – полипептид с молекулярной массой около 6 кДа, который играет важную роль в клеточных коммуникационных процессах. Он стимулирует пролиферацию и дифференцировку различных типов клеток. Это свидетельствует о возможности использования цитокина в качестве лекарственного средства для лечения целого ряда патологий. По-видимому, наиболее близки к практической реализации работы, направленные на применение ЭФР для лечения ран кожи, ожогов, трофических язв. Обнаружено значительное ускорение заживления роговицы глаз после ее хирургического повреждения у кроликов при применении глазных капель с ЭФР. Кроме того, данные о содержании ЭФР и его рецептора активно используются для разработки диагностических тестов.

Несмотря на явную перспективность использования цитокинов в качестве лекарственных средств, необходимо отметить, что они до сих пор не вошли в широкую медицинскую практику. Существуют, по-видимому, две основных причины объясняющие подобное положение. Первая причина заключается в крайне низком содержании цитокинов в биологических жидкостях и тканях, что делает нерентабельным их получение из этих источников. Вторая причина - относительно большая молекулярная масса, которая не позволяет использовать для этих целей методы химического синтеза. В настоящее время единственным, реальным источником получения цитокинов являются рекомбинантные

# Рекомбинантные (химерные) ДНК

Создаваемые генными инженерами рекомбинантные ДНК называют химерными. Они были созданы для самых разнообразных целей, в том числе и для целенаправленного воздействия на ВИЧ.

# Рекомбинантные (химерные) ДНК



А - Химерный белок, одной частью которого является растительный белок-яд рицин, а другой белок-рецептор CD4, за счет рецептора специфически взаимодействует только с теми клетками, на поверхности которых "торчит" вирусный белок gp120. В результате этого рицин, содержащийся в химерном белке, специфически убивает инфицированные клетки. Б - Подавление размножения ВИЧ достигается за счет "конкуренции" за связывание с регуляторным вирусным белком (Tat или Rev) между вирусной РНК и искусственными РНК-ловушками. Последние, в силу своей многочисленности, притягивают к себе большую часть регуляторного белка. Для РНК ВИЧ наступает дефицит соответствующего регуляторного белка. В условиях такого дефицита вирусная РНК не способна обеспечить продуктами полноценный цикл развития вируса.

Одна из испытанных схем с использованием химерных ДНК заключалась в следующем (см. рис.). К гену, кодирующему белок-рецептор [CD4](#), "подшили" другой ген, который обеспечивает синтез растительного белка [рицина](#). Риксин еще в средние века использовался в качестве сильнейшего яда. Попадая в клетку, он блокирует синтез белка в цитоплазме, тем самым убивая ее. После внесения в клетки такой рекомбинантной ДНК в конечном итоге происходит образование кодируемого ей химерного белка. Та его часть, которая соответствует белку-рецептору, обеспечивает строго специфическое связывание химеры с клетками, на поверхности которых содержится вирусный белок CD4. Другая же представляет собой яд риксин и уничтожает клетки, с которыми связывается химерная молекула. Таким образом, одна часть химеры обеспечивает направленный поиск в организме клеток, зараженных вирусом, а другая ее часть убивает их. Схема довольно проста и эффективна. В качестве "убийцы" можно использовать не только ген рикцина, но и некоторые другие гены.

Другой подход к борьбе с ВИЧ-инфекцией основан на способности некоторых вирусных белков ([Tat](#) и [Rev](#)), чрезвычайно важных для размножения ВИЧ в клетках, специфически связываться с определенными участками молекулы вирусной РНК ([рис.](#)). Для того, чтобы предотвратить этот жизненно важный процесс, было предложено вводить в инфицированные клетки искусственно синтезированные РНК, содержащие участки связывания с вирусными белками. Вирусному белку все равно, с чем связываться - с вирусной РНК или точно такой же "копией", сконструированной искусственно.

Добавленная в клетку в большом количестве, "копия" играет в данном случае роль "ловушки": если ее много, белок вируса будет связываться преимущественно с ней, а не с РНК вируса, и, в результате этого, ВИЧ перестанет размножаться.

**Как показали проведенные испытания, в изолированных клетках они работают очень хорошо. Однако нет надежных**